

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie



Kateřina Lorinčíková

Korekce pK_A konstant a elektroforetických mobilit
slabých elektrolytů na nulovou iontovou sílu

Zero Ionic Strength Corrections of pK_A Constants
and Electrophoretic Mobilities of Weak Electrolytes

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Bohuslav Gaš, CSc.

Praha, 2019

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Korekce pK_A konstant a elektroforetických mobilit slabých elektrolytů na nulovou iontovou sílu vypracovala pod vedením vedoucího bakalářské práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato bakalářská práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze dne

.....
podpis

Chtěla bych poděkovat prof. RNDr. Bohuslavu Gašovi, CSc. za trpělivost a vstřícnost, se kterou mě vedl při práci. Mé díky patří rovněž Mgr. Milanu Boublíkovi za jeho neocenitelnou pomoc při experimentální práci i vyhodnocování jejích výsledků. Nakonec upřímně děkuji všem členům naší laboratoře, kteří byli vždy ochotni poradit a pomoci, a poskytovali mi tak příjemnou pracovní atmosféru.

Abstrakt

Byly proměřeny závislosti elektroforetické mobility histidinu na pH ve dvou sadách pufrů o iontové síle 20 mM. Parametry získané z těchto křivek byly následně zkorigovány na nulovou iontovou sílu pomocí staršího přístupu a pomocí nově vyvinutého programu AnglerFish. Je ukázán vliv iontové atmosféry na pK_A a mobilitu a tvar příslušných korekcí, které umožňují stanovit pK_A a mobilitu při nekonečném zředění. Rovněž byla proměřena nová látka, imatinib, což je čtyřmocně kladně nabitá dusíkatá heterocyklická látka, a byly stanoveny její pK_A a mobility.

Klíčová slova

kapilární zónová elektroforéza, iontová síla, limitní mobilita, pK_A , korekce na nulovou iontovou sílu

Abstract

The dependencies of the electrophoretic mobility of histidine on pH were measured in two sets of buffers at 20mM ionic strength. The parameters, which were obtained from these curves, were subsequently corrected to zero ionic strength using an older approach, as well as using the newly developed program AnglerFish. The effect of the ionic atmosphere on the pK_A and mobility is shown, as well as the shape of the relevant corrections, which allow the determination of the pK_A and mobility at infinite dilution. A new compound, imatinib, which is a quadruple positively charged nitrogenous heterocyclic compound, was also measured, and its pK_A constants and mobilities were likewise determined.

Key Words

capillary zone electrophoresis, ionic strength, limiting mobility, pK_A , zero ionic strength corrections

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod	9
2 Teoretická část	10
2.1 Kapilární zónová elektroforéza	10
2.2 Běžné jevy	10
2.2.1 Elektroosmotický tok	10
2.2.2 Systémové zóny	11
2.2.3 Disperze zón	11
2.3 Histidin	12
2.4 Imatinib	13
2.5 Korekce na iontovou sílu	13
2.5.1 Korekce aktivitního koeficientu	14
2.5.2 Korekce elektroforetické pohyblivosti	15
2.5.3 Korekční algoritmus použitý v programu PeakMaster	16
2.5.4 Postup při ruční korekci	16
2.5.5 Korekce pomocí programu AnglerFish	17
3 Cíle práce	18
4 Experimentální část	19
4.1 Využité chemikálie a přístroje	19
4.2 Histidin v kyselých pufrch	20
4.2.1 Experimentální podmínky a postupy	20
4.2.2 Výsledky měření	22
4.2.3 Ruční korekce	26
4.2.4 Korekce pomocí AnglerFish	27
4.3 Histidin v bazických pufrch	28
4.3.1 Experimentální podmínky a postupy	28
4.3.2 Výsledky měření	30
4.3.3 Ruční korekce	35
4.3.4 Korekce pomocí AnglerFish	36
4.4 Porovnání hodnot	37
4.4.1 Porovnání pK_A konstant	37

4.4.1 Porovnání limitních mobilit.....	38
4.5 Imatinib.....	40
4.5.1 Experimentální podmínky a postupy.....	40
4.5.2 Výsledky měření.....	42
4.5.2 Ruční korekce.....	46
4.5.3 Korekce pomocí AnglerFish.....	47
4.5.4 Srovnání obou metod korekce.....	48
5 Závěr.....	50
6 Zdroje.....	51

Seznam zkratek

CZE	kapilární zónová elektroforéza
BGE	základní elektrolyt
EOF	elektroosmotický tok
UV-Vis	ultrafialová a viditelná část spektra
PB	polybren, také hexadimethrin bromid
DMSO	dimethylsufoxid
MES	kyselina 2-morfolinethansulfonová
MOPS	kyselina 4-morfolinpropansulfonová
CHES	kyselina 2-(cyklohexaamino)ethansulfonová
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
BISTRIS	bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane
GMP	guanosinmonofosfát
HVL	Haarhoff-Van der Lindeho funkce

1 Úvod

Doposud neexistuje spolehlivá metoda, jak ze sady naměřených dat efektivní elektroforetické mobility v závislosti na pH základních elektrolytů určit limitní hodnoty mobility a termodynamické disociační konstanty látek. Běžný postup byl takový, že se naměřená sada efektivních mobilit prokládala přímo Henderson-Hasselbalchovou křivkou. Získané efektivní mobility a pK_A konstanty se pak různými dílčími způsoby korigovaly na nulovou iontovou sílu. Tento způsob je ovšem principiálně nesprávný a dal se obtížně použít zvláště v případech, kdy se jednotlivé pK_A konstanty nacházely blízko sebe, méně než o dvě jednotky pH.

Postup, který byl vyvinut v naší laboratoři, využívá korekční algoritmus na nulovou iontovou sílu, který je použitý v softwaru PeakMaster. Nové na tomto postupu je, že se nefituje přímo experimentální křivka. Namísto toho jsou nejdříve jednotlivé experimentální hodnoty efektivních mobilit přepočteny na nulovou iontovou sílu a až ty se fitují Henderson-Hasselbalchovou křivkou. To poskytuje správné hodnoty limitních iontových mobilit a termodynamických pK_A konstant i v případech, kdy se pK_A konstanty nacházejí libovolně blízko u sebe.

Tento postup byl implementován v uživatelsky přátelském softwaru AnglerFish, který byl vytvořen v naší laboratoři Michalem Malým. Program je schopen brát do úvahy individuální složení každého základního elektrolytu, který je použit v sadě měření, a sada elektrolytů nemusí mít proto nutně jednotnou iontovou sílu.

Pro demonstraci výhod tohoto přístupu byly proměřeny závislosti mobility na pH pro histidin ve dvou různých sadách pufrů.

Odchytky při korekcích na iontovou sílu jsou značně patrné u vícenásobně nabitých látek. Z tohoto důvodu byla proměřena taktéž závislost imatinibu, který může být až čtyřmocně kladně nabitý. AnglerFish by měl umožnit správnější určení jeho charakteristik.

2 Teoretická část

2.1 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza je elektromigrační separační metoda, která umožňuje oddělit od sebe ionty na základně jejich odlišné rychlosti pohybu v elektrickém poli. Jakožto separační prostředí se využívá tenká zpravidla křemenná kapilára naplněná základním elektrolytem, který udržuje stabilní pH. Výhodu představuje nízká spotřeba vzorku, vysoká separační účinnost a vysoká rychlost analýzy.[1][2][3]

Tuto metodu lze využít pro separaci a analýzu celé řady ionogenních látek. Používá se pro separaci anorganických i organických sloučenin, včetně peptidů a složitějších biochemických látek.[3] V extrémních případech ji lze použít i pro separaci virů a bakterií.[4][5]

Existuje celá řada modifikací této metody, které umožňují větší selektivitu měření. Kapilární zónovou elektroforézu lze rovněž využít ke stanovování fyzikálně-chemických konstant látek.[6][7]

Teorie chování iontů v elektrickém poli je velice dobře popsána. V důsledku bylo vyvinuto několik programů, které umožňují předvídat chování systému při analýze, což usnadňuje nalézání vhodných podmínek pro měření.[8][9][10]

Většímu rozšíření elektroforézy brání nedostatečná robustnost a nízká opakovatelnost měření. Často se tedy využívá v kombinaci s dalšími metodami, například s hmotnostní spektrometrií CE-MS.[11][3]

2.2 Běžné jevy

2.2.1 Elektroosmotický tok

Mezi nejvýznamnější jevy, které snižují robustnost kapilární elektroforézy, se řadí elektroosmotický tok. Příčina spočívá ve skutečnosti, že ve vodném prostředí siloxanové skupiny na stěně křemenné kapiláry přecházejí na skupiny silanolové, které mají vlastnost slabé kyseliny. V zásaditých pH mají tedy tendenci odštěpovat vodíkové kationty a nést záporný náboj. V důsledku dochází k tomu, že se v blízkosti stěny nacházejí ve zvýšené koncentraci kationty. Při zapojení elektrického proudu tyto kationty putují ke katodě a

strhávají s sebou celý roztok uvnitř kapiláry. To znamená, že se kapilárou určitou rychlostí pohybuje celý roztok jako celek.

Na jednu stranu je možné tohoto jevu využít pro urychlení analýzy, v případě, že se analyzovaná látka pohybuje stejným směrem. Elektroosmotický tok rovněž způsobuje mnohem menší rozmytí zón analytů oproti pohybu kapaliny způsobeného tlakem, jelikož má plochý profil. Na stranu druhou však tento efekt zapříčiňuje nízkou opakovatelnost měření. Zejména v oblasti mezi pH 3 a 8 totiž způsobí i poměrně malá změna pH, vzniklá například nadávkováním vzorku, značný výkyv rychlosti elektroosmózy.[12] Značný vliv mají i povrchově aktivní látky, které pozmění stěnu kapiláry.

Existuje celá řada postupů, jak upravit povrch kapiláry, aby se elektroosmotický tok potlačil, stabilizoval nebo dokonce obrátil.[13][14][15]

2.2.2 Systémové zóny

Poměrně problematickým jevem jsou systémové zóny, které vznikají v důsledku porušení koncentrace základního elektrolytu nadávkováním vzorku. Jejich počet odpovídá počtu komponent BGE a v elektroferogramu se projevují jako „falešné píky“, které nenáleží analytu. Pokud dojde k překryvu systémové zóny se zónou analytu, prakticky to znemožňuje vyhodnocení. Naštěstí je však možné výskyt těchto píků poměrně spolehlivě předvídat a je tedy možné zvolit si takové podmínky měření, aby k překryvu pokud možno nedocházelo.[16]

2.2.3 Disperze zón

Dalším významným jevem je disperze zón. V ideálním případě by měly píky tvar úzkého Gaussovského píku. Existují čtyři zásadní jevy, které přispívají k narušení tohoto tvaru.

V první řadě Joulovo teplo, které vzniká při průchodu elektrického proudu kapilárou a ohřívá její vnitřek. Způsobuje disperzi píků. Jeho vliv je možné omezit použitím nižšího proudu.[17]

Další je adsorpce analytu na stěnu kapiláry, která může vést k deformaci píku, až k naprosté ztrátě analytu. Existuje celá řada metod sloužících k úpravě povrchu kapiláry, které mají za cíl adsorpci zabránit.[1]

Třetí je elektromigrační disperze, která má na svědomí trojúhelníkový tvar píků. Tento jev je způsoben rozdílnou elektroforetickou mobilitou analyzovaného iontu a koiontu, který je součástí BGE. V takových případech dochází k tomu, že se ionty podbíhají. Tento jev je možné omezit vhodnou volbou separačního prostředí. Migrační čas takto deformovaného píku je možné zjistit proložením Haarhoff-Van der Lindeho (HVL) funkcí.[18]

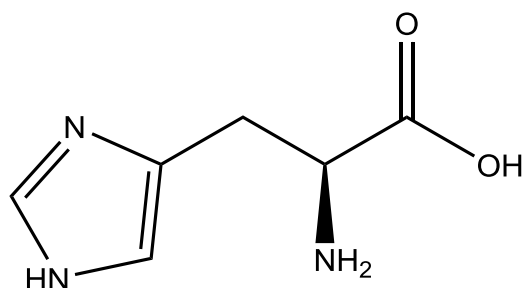
Poslední je podélná difúze, což je přesun látky způsobený koncentračním gradientem, a projevuje se symetrickým rozmýváním píků. Nelze ji potlačit, její vliv lze ovšem snížit zkrácením času analýzy.

Značná část těchto jevů je silně ovlivňována iontovou silou. Vyšší iontová síla snižuje distorzi píku, omezuje adsorpci na stěnu a zlepšuje selektivitu. Zároveň však vede ke snížení elektroosmotického toku, a tedy i rychlosti analýzy. Rovněž způsobuje snížení mobility. Jelikož k poklesu mobility se zvýšením iontové síly dochází rychleji pro nabitější molekuly, může dojít i k prohození zón analytu.[19][20]

2.3 Histidin

Histidin je jednou z esenciálních aminokyselin. Řadí se tedy mezi důležité stavební látky pro peptidy, bílkoviny a z nich složené vyšší struktury.

Stejně jako ostatní látky ze skupiny aminokyselin se vyznačuje amfolytickým chováním. V kyselém prostředí se tedy nabijí jeho dusíkaté skupiny a získává až dvojnásobný kladný náboj, v zásaditém prostředí se odštěpuje vodík z jeho karboxylové skupiny a molekula tak získává záporný náboj. Mezi těmito stavy existuje izoelektrický bod, což je pH, při kterém se jednotlivé náboje molekuly vyrovnávají, v důsledku čehož je celkový náboj nulový.



Obrázek 1 Histidin

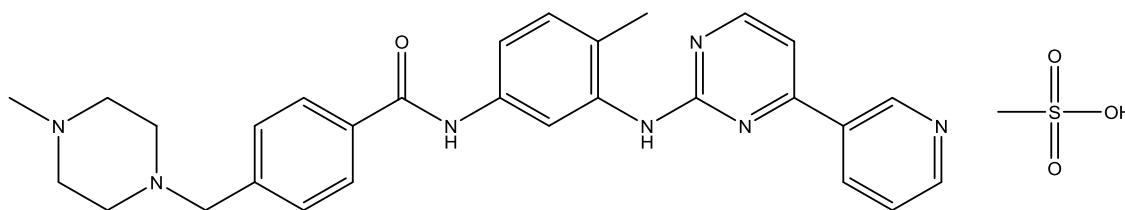
Rovnovážné acidobazické konstanty i limitní mobility této látky již byly změřeny mnoha autory a řadou různých metod. Jsou tedy známy. V publikovaných hodnotách je však značný rozptyl, zejména v případě parametrů pro dvojnásobně kladný náboj, jelikož je k jeho spolehlivému stanovení nezbytné pracovat v extrémně kyselém pH, čehož je experimentálně obtížné dosáhnout.[6][21][22]

2.4 Imatinib

Imatinib je složitý dusíkatý heterocyklus, který může mít za měřitelných podmínek až čtyřnásobný kladný náboj. K analýze se používá jeho mesylát z důvodů rozpustnosti.

Tato látka má využití v lékařské praxi. Používá se pro léčbu jistých forem leukémií a nádorových onemocnění.[23][24][25]

Rovnovážné acidobazické konstanty již byly stanovovány potenciometrickými titracemi, výsledky jsou ovšem různé a tedy nepříliš spolehlivé.[26] Limitní mobility této látky doposud nebyly stanovovány.



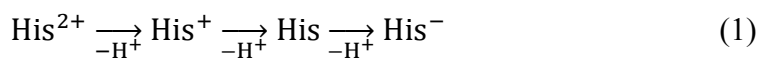
Obrázek 2 Imatinib mesylát

2.5 Korekce na iontovou sílu

Limitní elektroforetické mobility i rovnovážné acidobazické konstanty jsou silně závislé na hodnotě iontové síly. Z tohoto důvodu je nezbytné provádět korekce na nulovou iontovou sílu. Existuje celá řada přístupů, jak tuto problematiku řešit.

2.5.1 Korekce aktivního koeficientu

Disociační stupně histidinu lze popsat následujícím schématem:



Jednotlivé stupně je možno popsat následujícími smíšenými rovnovážnými konstantami K^{mix} , ve kterých vystupují koncentrace jednotlivých forem histidinu a aktivita vodíkových kationtů.

$$K_A^{\text{mix}} = \frac{c(\text{His}^-) \cdot a(\text{H}^+)}{c(\text{His})}$$

$$K_K^{\text{mix}} = \frac{c(\text{His}) \cdot a(\text{H}^+)}{c(\text{His}^+)}$$

$$K_{KK}^{\text{mix}} = \frac{c(\text{His}^+) \cdot a(\text{H}^+)}{c(\text{His}^{2+})} \quad (2)$$

Index A symbolizuje anionickou formu, K a KK jsou kationické, znásobení písmen odpovídá náboji formy. Tyto konstanty je možné získat z elektroforetických experimentů.

S pravou termodynamickou konstantou K jsou svázané přes aktivní koeficienty γ . Například pro jednomocně kladně nabitou formu vypadá vztah takto:

$$K_K = \frac{K_K^{\text{mix}}}{\gamma_K} \quad (3)$$

a γ_K zde představuje aktivní koeficient formy s nábojem +1.

Vztah mezi pravou a smíšenou termodynamickou konstantou lze pro jednotlivé formy zapsat i v logaritmickém tvaru.

$$\begin{aligned} (-1): \quad & \text{p}K_A = \text{p}K_A^{\text{mix}} - \log\gamma_A \\ (+1): \quad & \text{p}K_K = \text{p}K_K^{\text{mix}} + \log\gamma_A \\ (+2): \quad & \text{p}K_{KK} = \text{p}K_{KK}^{\text{mix}} + 3\log\gamma_A \\ (+3): \quad & \text{p}K_{KKK} = \text{p}K_{KKK}^{\text{mix}} + 5\log\gamma_A \\ (+4): \quad & \text{p}K_{KKKK} = \text{p}K_{KKKK}^{\text{mix}} + 7\log\gamma_A \end{aligned} \quad (4)$$

V závorce je uveden náboj formy, ke které se rovnice vztahuje. γ_A je ve všech rovnicích aktivní koeficient pro jednomocně nabitou formu.[27]

V limitním případě nekonečně zředěných roztoků je tyto koeficienty možné považovat za jednotkové, za vyšších koncentrací jsou ovšem menší než jedna a je tedy nutno provést korekci.

Korekce se zpravidla provádí podle rozšířené Debye-Hückelovy teorie:

$$\log\gamma_i = -\frac{Az_i^2\sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}} + CI \quad (5)$$

kde γ_i je aktivní koeficient, I je iontová síla roztoku v mol/dm³, a je velikost iontu, z_i je náboj i -té složky a A , B , C jsou konstanty pro danou teplotu a rozpouštědlo.

Za pokojové teploty je pro vodný pufr možné napsat:

$$\log\gamma_i = -\frac{0,50925z_i^2\sqrt{I}}{1 + 1,5\sqrt{I}} + 0,1z_i^2I \quad (6)$$

První sčítanec odpovídá Debye-Hückelově rovnici, která počítá s nespécifickými vzdálenými elektrostatickými interakcemi. Druhý člen součtu představuje specifickou interakci, ke které dochází při vyšší iontové síle.[19]

2.5.2 Korekce elektroforetické pohyblivosti

Onsager na základě teorie iontové atmosféry Debyeho a Hückela odvodil rovnici pro závislost vodivosti silného elektrolytu na jeho koncentraci. Tento model považuje ionty za bodové náboje a lze ho použít pouze pro zředěné binární elektrolyty.[9]

Pro mobilitu i -té složky μ_i lze rovnici napsat:

$$\mu_i = \mu_i^0 - (A\mu_i^0 + B)\sqrt{c} \quad (7)$$

kde μ_i^0 představuje limitní iontovou pohyblivost i -té složky a c je koncentrace roztoku. Faktor A odráží relaxační efekt způsobený polarizací iontu a jeho iontové atmosféry. Ve faktoru B je zahrnutý elektroforetický efekt, který je daný tím, že se iontová atmosféra pohybuje v opačné směru než ion a brzdí ho.[9]

Onsager a Fuoss tento model následně rozšířili. Opět jsou však ionty považované za bodové náboje.[9][20][28]

Rozšířený Onsagerův limitní zákon pro elektroforetickou mobilitu μ_i má tvar:

$$\mu_i = \mu_i^0 - (\mu_i^0 B_1 z_+ |z_-| \frac{q}{1 + \sqrt{q}} + |z_-| B_2) \frac{\sqrt{I}}{1 + Ba \sqrt{I}} \quad (8)$$

přičemž μ_i^0 je limitní mobilita i -té složky, a udává velikost iontu, q , B , B_1 a B_2 jsou konstanty pro danou teplotu a prostředí, z_+ a z_- jsou nábojová čísla aniontu a kationtu a I je iontová síla.[28]

S korekcí použitelnou při až 100mM iontové síle přišel Pitts, který ve svém modelu bere v úvahu konečnou velikost iontu. [29][9][7]

Později došlo k vývoji dalších empirických rovnic. [7][30]

2.5.3 Korekční algoritmus použitý v programu PeakMaster

PeakMaster je program vyvinutý v naší laboratoři, který umožňuje předvídat chování elektroforetických systémů.[8] Tento program zahrnuje algoritmus, který umožňuje korekci pK_A konstant a limitních mobilit na nenulovou iontovou sílu.

Pro korekci pK_A konstant využívá rozšířenou Debye-Hückelovu teorii, uvedenou v oddíle 2.5.1 v rovnici (5).

Pro korekci limitních elektroforetických mobilit využívá rozšířený Onsagerův-Fuossův limitní zákon ve tvaru:

$$\mu_i = \mu_i^0 - \left(\mu_i^0 B_1 z_i \sum_{n=0}^5 C_n R_i^{(n)} + |z_i| B_2 \right) \frac{\sqrt{\Gamma}}{1 + Ba \sqrt{\Gamma}} \quad (9)$$

kde význam většiny symbolů zůstává stejný, jak je tomu u rovnice (8). Γ v sobě zahrnuje vliv iontové síly a člen v sumaci představuje maticové vyjádření složení elektroforetického systému.[31][32]

2.5.4 Postup při ruční korekci

V případě, kdy se analyt nachází ve své plně disociované podobě, je možné korekční algoritmus uvedený v předchozím oddíle využít obráceně a zkorigovat mobilitu na nulovou iontovou sílu tzv. ruční korekcí.

Pro využití tohoto postupu se nejprve zkorigují disociační konstanty podle vztahů uvedených v rovnici (4). Do PeakMasteru se jakožto BGE zadá silná báze, pro záporně

nabité látky, nebo silná kyselina, pro kladně nabité látky, o iontové síle, při které se měřilo. Následně se zadá analyt s disociační konstantou odpovídající námi již zkorigované, a odhadne se limitní mobilita pro první disociační stupeň. Odhad se zkusmo upravuje, dokud efektivní mobilita vypočítaná PeakMasterem neodpovídá experimentálně stanovené hodnotě. Když je zkorigována limitní mobilita pro první stupeň, přidá se další stupeň a upravuje se analogickým způsobem. Jde tedy o iterační postup.[20][6][27]

Tento přístup je ovšem možné využít jedině v případě, že se disociační konstanty analytu nalézají dostatečně daleko od sebe. V případě, kdy jsou na sobě vzájemně závislé, je obtížné správně hodnoty odhadnout.

2.5.5 Korekce pomocí programu AnglerFish

Nově vyvinutý program AnglerFish využívá stejnou korekci na iontovou sílu, kterou používá PeakMaster. Pro všechna složení základních elektrolytů v sadě pufrů vypočte limitní mobility stanovované látky a tento soubor je pak fitován příslušnou regresní Henderson-Hasselbalchovou funkcí. Fitovanými parametry jsou termodynamické disociační konstanty a limitní mobility stanovované látky.

Výhoda tohoto postupu spočívá v tom, že je principiálně správný a udává správné hodnoty i v případě, kdy leží pK_A konstanty velmi blízko sebe. Bere v úvahu individuální složení jednotlivých základních elektrolytů, kterých bylo užito k měření, díky čemuž je možné použít sadu elektrolytů, která nemá stejnou iontovou sílu. V důsledku je možné dostat se při měření do extrémně kyselých a bazických pH, při kterých není možné dosáhnout nižší iontové síly.

Při práci s programem se postupuje tak, že se zadá složení veškerých použitých základních elektrolytů. Následně se zadá změřené pH těchto elektrolytů a program na tomto základě provede korekci koncentrace složek jednotlivých pufrů. K jednotlivým pufrům se zadají efektivní mobility měřeného analytu, které v nich byly naměřeny. Následně je nutné zadat kolikanásobně kladně a záporně může být analyt nabitý a provést počáteční odhad pK_A hodnot a limitních mobilit. Z těchto údajů AnglerFish dovede fitovat experimentální data a vypočítat výsledné korigované parametry.

3 Cíle práce

Cílem této práce bylo:

- Proměřit závislost efektivních mobilit na pH pro histidin ve dvou sadách pufrů, jedné založené na kyselině jako pufrující složce, druhé založené na bázi.
- Určit limitní mobility a pK_A konstanty pro histidin klasickými metodami i pomocí postupu vyvinutého v naší skupině a implementovaného v programu AnglerFish.
- Porovnat výsledky získané z obou měření a výsledky získané oběma metodami korekce a otestovat takto program AnglerFish
- Proměřit závislost efektivních mobilit na pH pro imatinib, čtyřmocně kladně nabitou dusíkatou heterocyklickou látku.
- Stanovit a zkorigovat limitní mobility a pK_A konstanty zjištěné pro imatinib.

4 Experimentální část

4.1 Využité chemikálie a přístroje

Analyty představoval histidin (Sigma Aldrich, Německo, > 99 %) a imatinib mesylát (Sigma Aldrich, Německo, > 98 %). Využito bylo rovněž GMP (Sigma Aldrich, Německo). Jakožto marker elektroosmotického toku bylo využito dimethylsulfoxidu (Sigma Aldrich, Německo, > 99,9 %). K úpravě povrchu kapiláry byl využit hexadimethrin bromid (Sigma Aldrich, Německo, > 94 %) a dextransulfát (Sigma Aldrich, Německo).

Pro přípravu základního elektrolytu byly využity následující chemikálie: monohydrát hydroxidu lithného (Sigma Aldrich, Německo, > 99 %), kyselina chlorovodíková (Sigma Aldrich, Německo, 37 %), kyselina fosforečná (Lachema, Česká republika, 85 %), kyselina mravenčí (Honeywell, Německo, > 95 %), kyselina octová (Sigma Aldrich, Německo, > 99 %), MES (Sigma Aldrich, Německo, > 99 %), MOPS (Sigma Aldrich, Německo, > 99,5 %), tricin (Sigma Aldrich, Německo, > 99,0 %), CHES (Sigma Aldrich, Německo, > 99,0 %), β -alanin (Sigma Aldrich, Německo, > 99 %), prolin (Sigma Aldrich, Německo, > 99 %), pyridin (Sigma Aldrich, Německo, > 99,0 %), BIS-TRIS (Sigma Aldrich, Německo, 98,0 %), imidazol (Honeywell Fluka, Německo, > 99,5 %), TRIS (Sigma Aldrich, Německo, > 99,9 %), ethanolamin (Sigma Aldrich, Německo, > 99,0 %), piperidin (Sigma Aldrich, Německo, > 99,5 %), dimethylpyridin (Sigma Aldrich, Německo, > 99 %), morfolin (Sigma Aldrich, Německo, > 99,5 %).

K proplachování kapiláry byly použity 1M a 0,1M roztoky hydroxidu sodného (Agilent Technologies, Německo).

Měření probíhalo v přístroji pro kapilární elektroforézu CE 7100 (Agilent Technologies, Německo), který má zabudovaný UV-Vis detektor. Přístroj byl řízen programem ChemStation (Agilent Technologies, Německo). Data byla dále vyhodnocována v programu CEval 0.6h5 (vytvořen v naší skupině) a následně zpracována v programech Origin 10.5.31 (Origin Lab, Spojené království), AnglerFish (vytvořen v naší skupině) a Microsoft Excel 2010 (Microsoft, USA). K naplánování podmínek měření byl použit program PeakMaster 6 (vytvořen v naší skupině).

K měření byly využívány křemenné kapiláry o vnitřních průměrech 25 a 50 μm a vnějším průměru 375 μm . Délky kapilár byly 77,7 cm v případě 25 μm kapiláry.

V případě 50 μ m kapilár byly délky 49,9 cm, 50,45 cm, a 50,3 cm. K UV-Vis detektoru bylo vždy o 8,5 cm blíže.

Měření probíhalo při teplotě 25 °C.

Při měření v 25 μ m kapilárách byl k přístroji přiveden externí tlak připojením lahve se stlačeným dusíkem (Linde Gas, Německo), která umožňovala dosáhnout tlaku až 12 bar.

4.2 Histidin v kyselých pufrách

4.2.1 Experimentální podmínky a postupy

Před prvním měřením byly elektrody přístroje očištěny v ultrazvukové lázni. Nejprve byly po 10 minut ponořeny do deionizované vody a následně po 10 minut do isopropanolu. Byla připravena nová kapilára o délce 77,7 cm a vnitřním průměru 25 μ m.

Bylo připraveno 5 ml 3% dextransulfátu a 5% hexadimethrin bromidu. Povrch kapiláry byl upraven koutováním. Nejprve byla kapilára propláchnuta 1M roztokem hydroxidu sodného. Poté se 20 minut proplachovala roztokem hexadimethrin bromidu, následně 20 minut roztokem dextransulfátu. Nakonec opět 20 minut roztokem hexadimethrin bromidu. Před použitím se kapilára propláchla deionizovanou vodou. Před každým měřením pak byla proplachována základním elektrolytem.

Byly připraveny zásobní roztoky následujících látek o koncentraci 0,5 M: hydroxid lithný, kyselina fosforečná, kyselina mravenčí, kyselina octová, MES, MOPS, Tricin, CHES, β -alanin. Z těchto zásobních roztoků byla připravena sada pufrů o iontové síle 50 mM.

Sada byla naředěna na iontovou sílu přibližně 20 mM. Složení jednotlivých pufrů, jejich pH, pufrální kapacity a iontové síly jsou uvedeny v Tabulce 1. pH každého pufru bylo změřeno třikrát, uveden je aritmetický průměr. Pufrální kapacita byla vypočítána v programu PeakMaster.

Tabulka 1 Složení, pH, pufrací kapacita β a iontová síla I základního elektrolytu

pufr	c_{Li}	$c_{kyselina}$	pH	β	I
-	mM	mM	-	mM	mM
Fosfát/Li	16	40	2,221	38,34	22,86
Fosfát/Li	17,2	34	2,381	29,10	22,10
Fosfát/Li	18,4	28	2,636	18,38	21,27
Fosfát/Li	19,2	24	2,950	9,99	20,66
Formiát/Li	19,72	80	3,191	36,54	20,40
Formiát/Li	19,84	56	3,420	30,70	20,25
Formiát/Li	19,88	44	3,587	25,78	20,15
Formiát/Li	19,96	32	3,878	17,53	20,10
Acetát/Li	20	80	4,241	34,77	20,07
Acetát/Li	20	48	4,592	26,95	20,03
Acetát/Li	20	34	4,918	18,99	20,02
Acetát/Li	20	28,8	5,144	14,09	20,01
MES/Li	20	120	5,452	38,40	20,01
MES/Li	20	76	5,711	33,94	20,00
MES/Li	20	48	6,013	26,87	20,00
MES/Li	20	34	6,334	18,96	20,00
MES/Li	20	28	6,604	13,16	20,00
MOPS/Li	20	80	6,670	34,54	20,00
MOPS/Li	20	52	6,955	28,34	20,00
MOPS/Li	20	36	7,239	20,47	20,00
MOPS/Li	20	28	7,561	13,16	20,00
Tricin/Li	20	56	7,816	29,61	20,00
Tricin/Li	20	36	8,185	20,47	20,00
Tricin/Li	20	28	8,508	13,17	20,00
CHES/Li	20	120	8,642	38,38	20,00
CHES/Li	20	76	8,905	33,95	20,00
CHES/Li	20	52	9,155	28,38	20,00

puftr	c_{Li}	$c_{kyselina}$	pH	β	I
-	mM	mM	-	mM	mM
CHES/Li	20	38	9,409	21,91	20,00
CHES/Li	20	30	9,641	15,57	20,00
β -alanin/Li	20	48	10,116	27,10	20,00
β -alanin/Li	20	36	10,338	21,02	19,99
β -alanin/Li	20	28	10,601	14,51	19,99
β -alanin/Li	20	24	10,792	10,42	19,98
β -alanin/Li	20,04	22	10,943	8,61	20,01
β -alanin/Li	20,08	20,4	11,095	7,94	20,04
β -alanin/Li	20,12	18,4	11,309	8,86	20,05

Vzorek byl připraven tak, že byl nejprve připraven 10mM roztok histidinu. Do 500 μ l vialky bylo vpraveno 20 μ l tohoto roztoku, dále 10 μ l 3% roztoku DMSO a 470 μ l aktuálního základního elektrolytu. Koncentrace histidinu ve vzorku tedy byla 0,4 mM.

Dávkování bylo při měření prováděno hydrodynamicky tlakovým rozdílem 50 mbar po 50 s.

K přístroji byla připojena lahev se stlačeným dusíkem, která umožňovala dosáhnout tlaku až 12 bar.

Měření probíhalo při napětí 25 kV. Pro ověření, že výsledná síla pole nemá vliv na mobilitu analytu, se provedlo zkušební měření při napětí 15 kV. V každém puffru bylo měření provedeno třikrát.

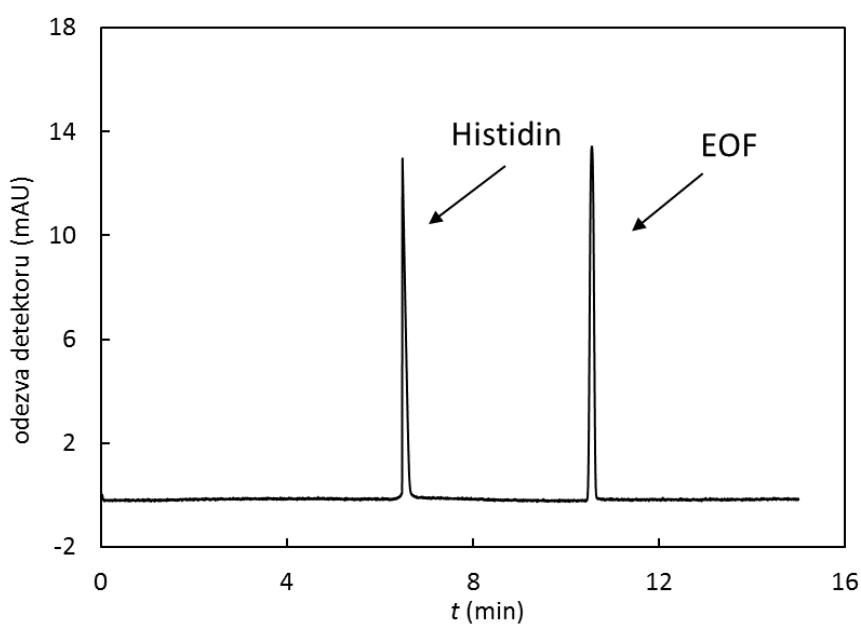
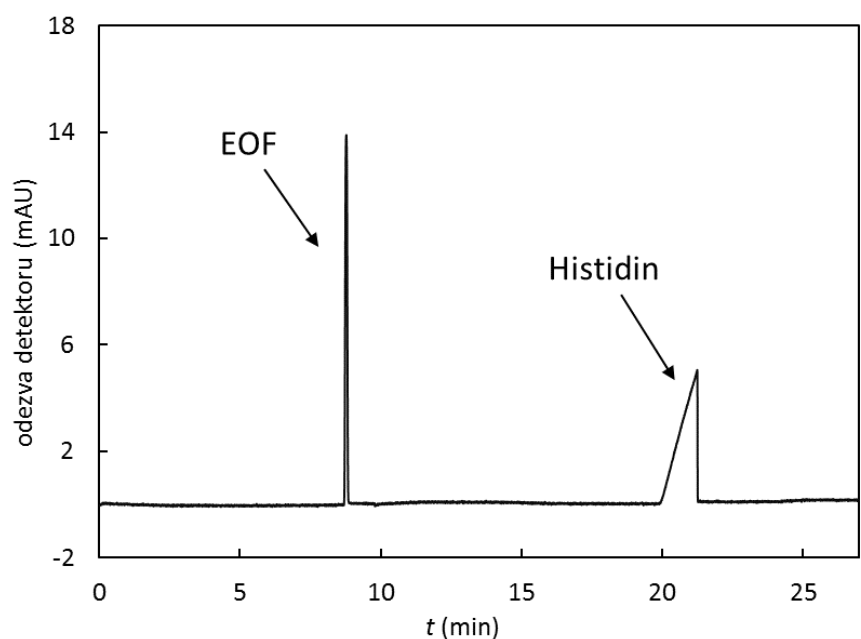
K detekci analytu byl využíván zabudovaný UV-Vis detektor. Migrační čas analytu byl vyhodnocován v programu CEval.

4.2.2 Výsledky měření

Využití 25 μ m kapiláry umožnilo provádět měření při vyšším napětí, jelikož docházelo k menšímu vzniku Joulova tepla. Pro práci bylo nutné využít externí tlak.

Pokrytí vnitřní stěny kapiláry zapříčinilo otočení a stabilizaci elektroosmotického toku. Napětí tedy bylo přiváděno ke kladné elektrodě a elektroosmotický tok se pohyboval ve směru aniontů.

V kyselé oblasti byl histidin kladně nabitý, což znamená, že putoval s nižší pohyblivostí, než je pohyblivost elektroosmotického toku (Obrázek 3). Pík histidinu je silně deformován elektromigrační disperzí. Pík DMSO, který se pohyboval s pohyblivostí elektroosmotického toku, má Gaussovský tvar. Při přechodu do zásadité oblasti získal histidin záporný náboj a pohyboval se tedy se zápornou mobilitou a rychleji než elektroosmotický tok (Obrázek 4).



Obrázek 4 Signál histidinu v pufru o složení B-alanin/Li 36/20 při 214 nm, 25 kV, PB coating

Migrační čas byl určován programem CEval z elektroferogramu získaného detekcí při 214 nm. Pomocí tohoto programu byly rovněž vypočítané efektivní mobility analytu, které jsou uvedeny v Tabulce 2.

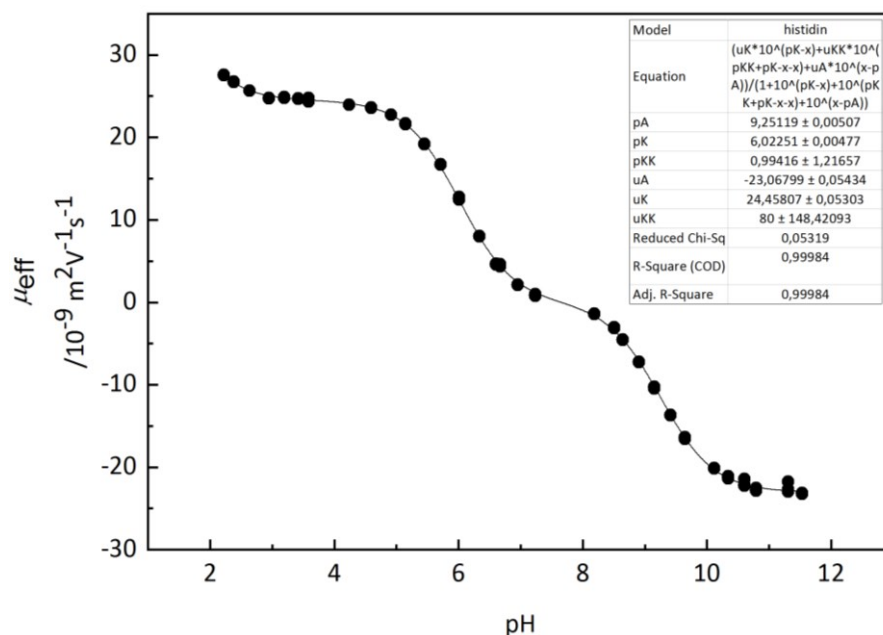
Tabulka 2 Hodnoty efektivní mobility histidinu naměřené v jednotlivých pufrch o určitém pH, uvedené se směrodatnou odchylkou σ vypočtenou ze tří až pěti opakovaných měření

pH	$\mu_{\text{eff}} \pm \sigma$ $10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$	pH	$\mu_{\text{eff}} \pm \sigma$ $10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$	pH	$\mu_{\text{eff}} \pm \sigma$ $10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$
2,219	27,58±0,02	5,145	21,61±0,05	8,645	-4,53±0,02
2,382	26,72±0,04	5,452	19,17±0,02	8,905	-7,24±0,03
2,637	25,65±0,01	5,452	16,73±0,03	9,155	-10,33±0,08
2,950	24,77±0,03	5,711	12,59±0,11	9,411	-13,70±0,05
3,192	24,82±0,04	6,013	8,02±0,01	9,642	-16,48±0,07
3,421	24,69±0,02	6,604	4,62±0,05	10,117	-20,14±0,02
3,587	24,66±0,07	6,67	4,43±0,12	10,339	-21,21±0,11
3,587	24,32±0,01	6,955	2,12±0,01	10,602	-22,0±0,3
4,237	23,97±0,01	7,237	0,88±0,08	10,795	-22,73±0,11
4,591	23,58±0,01	8,186	-1,39±0,02	11,307	-23,5±0,5
4,917	22,7±0,01	8,508	-3,11±0,06	11,532	-23,21±0,04

Efektivní mobility byly vyneseny do programu Origin a proloženy regresní funkcí ve tvaru:

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\mu_{\text{KK}} \cdot 10^{\text{pK}_{\text{KK}} + \text{pK}_{\text{K}} - 2\text{pH}} + \mu_{\text{K}} \cdot 10^{\text{pK}_{\text{K}} - \text{pH}} + \mu_{\text{A}} \cdot 10^{\text{pH} - \text{pK}_{\text{A}}}}{1 + 10^{\text{pK}_{\text{KK}} + \text{pK}_{\text{K}} - 2\text{pH}} + 10^{\text{pK}_{\text{K}} - \text{pH}} + 10^{\text{pH} - \text{pK}_{\text{A}}}} \quad (10)$$

kde μ_{KK} , μ_{K} , μ_{A} jsou pohyblivosti jednotlivých forem a pK_{KK} , pK_{K} a pK_{A} jejich rovnovážné disociační konstanty.



Obrázek 5 Závislost mobility na pH pro histidin měřený v kyselých pufrách proložený příslušnou fitovací funkcí

Proložením regresní funkcí byly získané následující hodnoty pro iontovou sílu 20 mM:

Tabulka 3 Nezkorigované limitní mobility histidinu v absolutní hodnotě se směrodatnými odchylkami σ

Náboj	μ_{lim}	σ
-	$10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$	$10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$
-1	23,068	0,060
+1	24,458	0,053
+2	80	148

Tabulka 4 Nezkorigované smíšené pK_A hodnoty histidinu se směrodatnými odchylkami σ

Náboj	pK_A	σ
-	-	-
-1	9,2512	0,0051
+1	6,0225	0,0048
+2	0,99	1,22

Zřejmě z důvodu, že byla sada pufrů připravena ředěním, došlo k tomu, že nezasahuje dostatečně daleko do extrémních pH, což se při tomto měření projevilo zejména

v silně kyselé oblasti. Disociační konstanta pro dvojnásobně kladně nabitou formu histidinu se nachází v oblasti, kterou pufrы nepokryly. V důsledku chybějících dat v této oblasti nebylo přímým fitováním možné rozumně stanovit pK_A konstantu ani limitní mobilitu formy +2 a výsledky jsou zatíženy velikou chybou. Ostatní disociační stupně byly vyhodnoceny s vyhovující přesností.

4.2.3 Ruční korekce

Korekce pK_A konstant byla provedena podle rovnic (4) uvedených v oddíle 2.5.1. Konstanty získané přímým fitováním byly pokaždé upraveny odečtením nebo přičtením vhodného násobku logaritmu aktivitního koeficientu.

Nutno upozornit, že aktivitní koeficient byl vypočítán pro iontovou sílu 20 mM. Jak je ovšem patrné z Tabulky 1, udávající složení základních elektrolytů, ne všechny pufrы měly stejnou iontovou sílu. Může za to skutečnost, že původní pufrы připravené pro 50mM iontovou sílu měly složení přesně odpovídající žádané iontové síle. Při naředění pufrů na 2/5 koncentraci ovšem v případě silně kyselých a silně zásaditých pufrů nedošlo k ekvivalentnímu snížení iontové síly na 2/5 původní. Z tohoto opomenutí tedy může plynout chyba.

Tabulka 5 Ručně zkorigované pK_A konstanty histidinu se směrodatnými odchylkami σ , měřeno v kyselých pufrách

Náboj	pK_A	σ
-	-	-
-1	9,3086	0,0051
+1	5,9651	0,0048
+2	0,82	1,22

Korekce limitních mobilit proběhla pomocí programu PeakMaster, způsobem uvedeným v oddíle 2.5.3. Pro náboj -1 se provedla korekce na 20mM lithium coby základní elektrolyt, pro +1 na 20mM kyselinu chlorovodíkovou. Jelikož byla mobilita pro stupeň +2 vypočtena s příliš velkou chybou, nemělo s ní smysl dále pracovat.

Tabulka 6 Ručně zkorigované limitní mobility histidinu se směrodatnými odchylkami σ , měřeno v kyselých pufrách

Náboj	μ_{lim}	σ
-	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$
-1	26,814	0,060
+1	28,185	0,053

4.2.4 Korekce pomocí AnglerFish

Korekce pomocí programu AnglerFish byla provedena dle postupu uvedeného v oddíle 2.5.4. Do programu byly zadáno složení použitých pufrů a mobility histidinu naměřené jejich užitím.

Z kyselých pufrů byly pro histidin získané následující hodnoty limitních mobilit a pK_A :

Tabulka 7 Limitní mobility histidinu zkorigované na nulovou iontovou sílu pomocí AnglerFish se směrodatnými a relativními odchylkami σ a r , měřeno v kyselých pufrách

Náboj	μ_{lim}	σ	r
-	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	%
-1	27,341	0,033	0,12
+1	28,736	0,032	0,11
+2	63,2	20,6	32,5

Tabulka 8 pK_A hodnoty histidinu zkorigované na nulovou iontovou sílu pomocí AnglerFish se směrodatnými a relativními odchylkami σ a r , měřeno v kyselých pufrách

Náboj	pK_A	σ	r
-	-	-	%
-1	9,3032	0,0030	0,032
+1	5,9647	0,0028	0,047
+2	1,17	0,33	28,4

Jak je patrné, program si i s výsledky pro disociační stupeň +2 poradil snáze, než se tomu podařilo využitím přímého fitování a ruční korekce. Přesto jsou však i zde příslušné hodnoty zatíženy znatelnou chybou. Ostatní disociační stupně jsou stanoveny s malou směrodatnou odchylkou.

4.3 Histidin v bazických pufrách

4.3.1 Experimentální podmínky a postupy

Před prvním měřením byly elektrody přístroje očištěny v ultrazvukové lázni. Nejprve byly po 10 minut ponořeny do deionizované vody a následně po 10 minut do isopropanolu. Byla připravená nová kapilára o délce 49,9 cm a vnitřním průměru 50 μm . Tato kapilára byla před prvním měřením propláchnuta 1M roztokem hydroxidu sodného a deionizovanou vodou. Před každým měřením byla proplachována základním elektrolytem.

V kyselé oblasti byla kapilára koutována hexadimethrin bromidem, postupem uvedeným v oddíle 4.2.1.

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky následujících látek o koncentraci 0,5 M: prolin, β -alanin, pyridin, BIS-TRIS, imidazol, TRIS, ethanolamin, piperazin. Také byl připraven 0,2 M roztok kyseliny chlorovodíkové.

Smísením zásobních roztoků v příslušných poměrech byla připravena sada pufrů o iontové síle zhruba 20 mM.

Složení jednotlivých pufrů, jejich pH, pufrací kapacity a iontové síly jsou uvedeny v Tabulce 9. pH každého pufru bylo změřeno třikrát, uveden je aritmetický průměr. Pufrací kapacita byla vypočítána v programu PeakMaster. Koncentrace kyseliny chlorovodíkové je ve všech pufrách 20 mM.

Tabulka 9 Složení, pH, pufrční kapacita β a iontová síla I základního elektrolytu, koncentrace HCl je pro všechny pufrů 20 mM

pufr	$C_{\text{báze}}$ mM	pH	β mM	I mM
HCl/prolin	25	2,107	36,42	20,00
HCl/prolin	40	2,269	36,16	20,00
HCl/prolin	100	2,659	39,33	20,00
HCl/prolin	200	2,978	42,09	20,00
HCl/prolin	400	3,319	43,91	20,00
HCl/ β -alanin	40	3,645	23,86	20,00
HCl/ β -alanin	60	3,937	30,99	20,00
HCl/ β -alanin	100	4,243	36,93	20,00
HCl/ β -alanin	180	4,556	40,96	20,00
HCl/ β -alanin	300	4,823	42,99	20,00
HCl/pyridin	30	5,113	15,39	20,00
HCl/pyridin	40	5,393	23,04	20,00
HCl/pyridin	60	5,634	30,71	20,00
HCl/pyridin	100	5,963	36,84	20,00
HCl/pyridin	180	6,255	40,94	20,00
HCl/BIS-TRIS	40	6,650	23,03	20,00
HCl/BIS-TRIS	60	6,959	30,70	20,00
HCl/BIS-TRIS	80	7,127	34,54	20,00
HCl/imidazol	40	7,059	23,03	20,00
HCl/imidazol	60	7,356	30,70	20,00
HCl/midazol	100	7,659	38,84	20,00
HCl/imidazol	180	7,957	40,94	20,00
HCl/TRIS	40	8,162	23,03	20,00
HCl/TRIS	60	8,479	30,71	20,00
HCl/TRIS	100	8,766	36,86	20,01
HCl/TRIS	180	9,069	40,99	20,01

pufř	<i>C</i> _{báze}	pH	β	<i>I</i>
-	mM	-	mM	mM
HCl/ethanolamin	33	9,426	18,19	20,03
HCl/ethanolamin	45	9,709	25,71	20,05
HCl/ethanolamin	70	10,010	33,23	20,10
HCl/ethanolamin	120	10,312	39,15	20,20
HCl/ethanolamin	220	10,604	43,55	20,40
HCl/piperidin	30	10,910	16,48	20,77
HCl/piperidin	40	11,206	26,33	21,49
HCl/piperidin	65	11,545	41,58	23,15
HCl/piperidin	120	11,845	61,79	26,30
HCl/piperidin	200	12,049	82,23	30,13

Vzorek byl připraven tak, že byl nejprve namíchán 10mM roztok histidinu. Do 500 μ l vialky bylo vpraveno 20 μ l tohoto roztoku, dále 10 μ l 3% roztoku DMSO, 10 μ l 5mM GMP a 460 μ l aktuálního základního elektrolytu. Koncentrace histidinu ve vzorku tedy byla 0,4 mM. GMP bylo přítomno pouze při měřeních od pyridinových po piperidinové pufřy, pro prolinové a β -alaninové pufřy se od jeho měření upustilo, a nepřidávalo se tedy do vzorku. V této oblasti se do vzorku přidávalo 470 μ l aktuálního základního elektrolytu.

Dávkování bylo při měření prováděno hydrodynamicky tlakovým rozdílem 30 mbar po 5 s.

Měření probíhalo při napětí 10 kV. V případě kyselých pufřů bylo rovněž nezbytné působit tlakem 30 mbar.

K detekci analytu byl využíván UV-Vis detektor. Migrační čas analytu byl vyhodnocován v programu CEval.

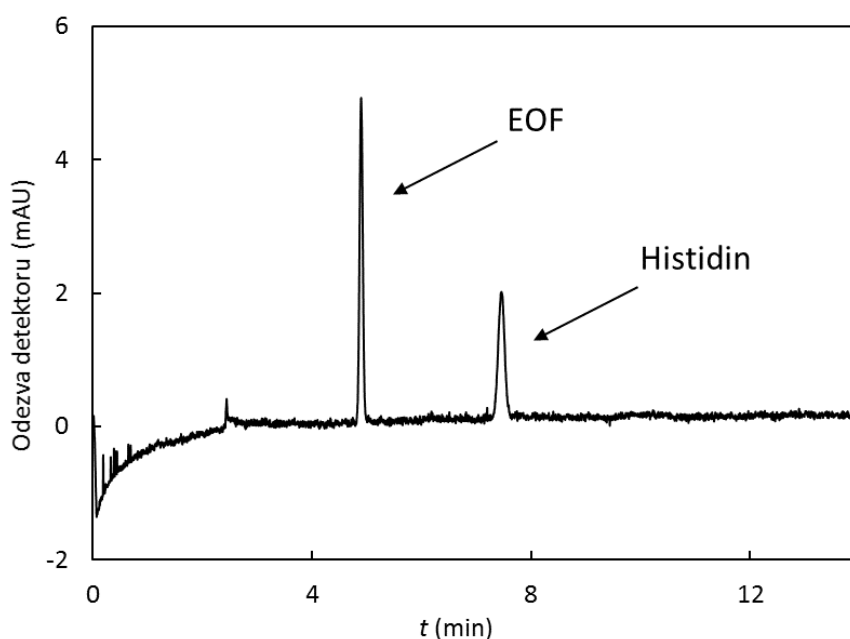
4.3.2 Výsledky měření

Jelikož byla použita širší kapilára, oproti měření v pufřech založených na kyselé složce zde bylo nutno použít nižší napětí, aby se zamezilo nadbytečnému vzniku Joulova tepla. Každé měření bylo provedeno minimálně třikrát.

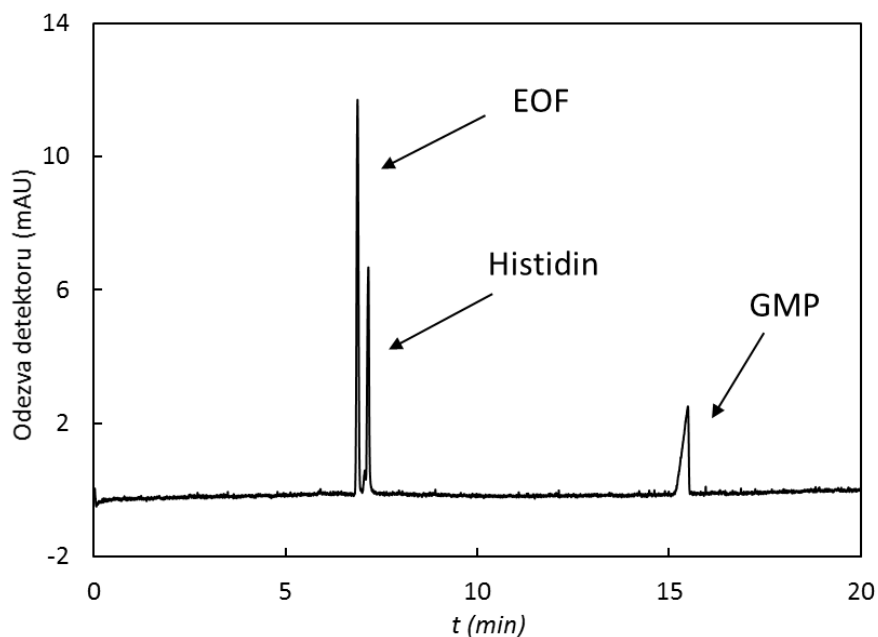
Při měření v pufrch obsahujících prolin a β -alanin byla kapilára pokryta polybrenem, systém se tedy choval stejně jako při předchozím měření, popsaném v oddílu 4.2.2. Při měření v pufrch obsahujících pyridin až piperidin nebyl povrch kapiláry nijak upravován, elektroosmotický tok se tedy pohyboval ve směru kationtů a silně závisel na pH.

Během měření, která probíhala v kapiláře potažené polybrenem, byl histidin kladně nabitý a pohyboval se tedy pomaleji než EOF (př. Obrázek 6). Pík histidinu je nepatrně deformován elektromigrační disperzí. Pík DMSO, který putoval s pohyblivostí elektroosmotického toku, má Gaussovský tvar.

Při měřeních probíhajících v nemodifikované křemenné kapiláře, se stále kladně nabitý histidin pohyboval rychleji než elektroosmotický tok. Při přechodu do zásadité oblasti získal histidin záporný náboj a procházel tedy kapilárou pomaleji než DMSO (obrázek 7).



Obrázek 6 Signál histidinu v pufru o složení β -alanin/HCl 40/20 při 214 nm, 10 kV, PB coating



Obrázek 7 Signál histidinu a GMP v pufru o složení TRIS/HCl 40/20 při 214 nm, 10 kV

GMP může být až trojmocně záporně nabitý, za jakýchkoliv pH se tedy zdržoval za elektroosmotickým tokem. Podléhal ovšem silné elektromigrační disperzi a adsorboval se na stěny kapiláry. V důsledku se nepodařilo najít podmínky, za nichž by bylo možné užitým přístupem proměřit celou křivku GMP. Proto se od toho upustilo a měření bylo dokončeno pouze pro histidin.

Migrační čas byl určován programem CEval z elektroferogramu získaného detekcí při 214 nm, pomocí tohoto programu byly vypočteny efektivní mobility analytu, které jsou uvedené v Tabulce 10.

Tabulka 10 Naměřené efektivní mobility a jejich směrodatné odchylky pro histidin v jednotlivých pufrích, uvedené se směrodatnou odchylkou vypočtenou ze tří až pěti opakovaných měření

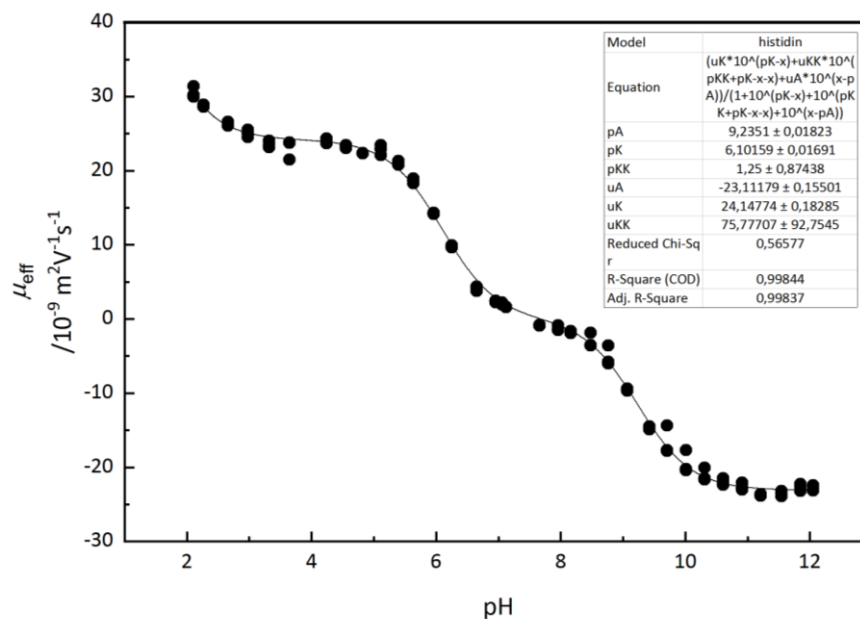
pH	$\mu_{\text{eff}} \pm \sigma$ $10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$	pH	$\mu_{\text{eff}} \pm \sigma$ $10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$	pH	$\mu_{\text{eff}} \pm \sigma$ $10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$
2,107	30,4±0,6	5,634	18,7±0,2	8,766	-5,9±0,1
2,269	28,7±0,1	5,963	14,2±0,1	9,069	-9,6±0,1
2,659	26,4±0,2	6,255	9,8±0,1	9,426	-14,6±0,2
2,978	25,1±0,4	6,650	4,1±0,3	9,709	-17,7±0,1
3,319	23,5±0,4	6,959	2,4±0,1	10,010	-20,2±0,1
3,645	23,8±0,1	7,127	1,61±0,02	10,312	-21,6±0,1
3,937	25,4±1,6	7,059	2,1±0,1	10,604	-22,1±0,2
4,243	24,1±0,3	7,356	-	10,910	-22,9±0,1
4,556	23,3±0,1	7,659	-0,83±0,04	11,206	-23,7±0,1
4,823	22,33±0,03	7,957	-1,50±0,1	11,545	-23,6±0,3
5,113	22,9±0,5	8,162	-1,90±0,03	11,845	-22,8±0,4
5,393	21,1±0,2	8,479	-3,55±0,04	12,049	-22,5±0,1

Elektroferogram pro pufr při pH 7,356 nebylo možné vyhodnotit, protože se zóna analytu překrývala se zónou DMSO.

Efektivní mobility μ_{eff} naměřené při příslušných pH byly vyneseny do grafu v programu Origin a proloženy příslušnou regresní funkcí ve tvaru:

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\mu_{\text{KK}} \cdot 10^{\text{pK}_{\text{KK}} + \text{pK}_{\text{K}} - 2\text{pH}} + \mu_{\text{K}} \cdot 10^{\text{pK}_{\text{K}} - \text{pH}} + \mu_{\text{A}} \cdot 10^{\text{pH} - \text{pK}_{\text{A}}}}{1 + 10^{\text{pK}_{\text{KK}} + \text{pK}_{\text{K}} - 2\text{pH}} + 10^{\text{pK}_{\text{K}} - \text{pH}} + 10^{\text{pH} - \text{pK}_{\text{A}}}} \quad (10)$$

kde μ_{KK} , μ_{K} , μ_{A} jsou pohyblivosti jednotlivých forem a pK_{KK} , pK_{K} a pK_{A} jejich rovnovážné disociační konstanty.



Obrázek 8 Závislost mobility na pH pro histidin měřený v bazických pufrách proložený příslušnou fitovací funkcí

Proložením fitovací funkcí byly získané následující hodnoty pro 20mM iontovou sílu:

Tabulka 11 Nezkorigované limitní mobility histidinu se směrodatnými odchylkami σ

Náboj	μ_{lim}	σ
-	$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
-1	23,11	0,16
+1	24,15	0,18
+2	75,8	92,8

Tabulka 12 Nezkorigované smíšené pK_A hodnoty histidinu se směrodatnými odchylkami σ

Náboj	pK_A	σ
-	-	-
-1	9,235	0,018
+1	6,102	0,017
+2	1,25	0,87

Přestože použitá sada pufrů sahala oproti té, jež byla použita v předchozím oddíle (4.2.2), do kyselější oblasti, nestačilo to ke spolehlivému určení hodnot pro dvojnásobně kladně nabitou formu histidinu. Tyto hodnoty jsou tedy zatíženy významnou chybou.

4.3.3 Ruční korekce

Korekce pK_A konstant byla provedena podle rovnic (4) uvedených v oddíle 2.5.1.

Stejně, jak tomu bylo v oddíle 4.2.3, i zde je nutno upozornit, že byl aktivitní koeficient vypočítán pro iontovou sílu 20 mM. V Tabulce 9 ovšem vidíme, že iontová síla nebyla pro všechny pufrы jednotná. V tomto případě je ovšem na vině skutečnost, že se pro usnadnění přípravy pufrů zachovala ve všech pufrech jednotná koncentrace kyseliny chlorovodíkové. Pro korekci pomocí programu AnglerFish není jednotná iontová síla třeba, proto bylo usouzeno, že si toto opomenutí můžeme dovolit.

Tabulka 13 Ručně zkorigované pK_A konstanty histidinu se směrodatnými odchylkami σ , měřeno v bazických pufrech

Náboj	pK_A	σ
-	-	-
-1	9,293	0,018
+1	6,044	0,017
+2	1,08	0,87

Korekce limitních mobilit proběhla iteračně pomocí programu PeakMaster, stejně jako v oddíle 4.3.2., způsobem uvedeným v oddíle 2.5.3. Mobilita pro disociační stupeň +2 byla vynechána.

Tabulka 14 Ručně zkorigované limitní mobility histidinu se směrodatnými odchylkami σ , měřeno v bazických pufrech

Náboj	μ_{lim}	σ
-	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$
-1	26,86	0,16
+1	27,86	0,18

4.3.4 Korekce pomocí AnglerFish

Korekce pomocí programu AnglerFish byla provedena dle postupu uvedeného v oddíle 2.5.4. V bazických pufrch vypadají hodnoty získané pro histidin následujícím způsobem:

Tabulka 15 Limitní mobility histidinu zkorigované na nulovou iontovou sílu pomocí AnglerFish se směrodatnými a relativními odchylkami σ a r , měřeno v bazických pufrch

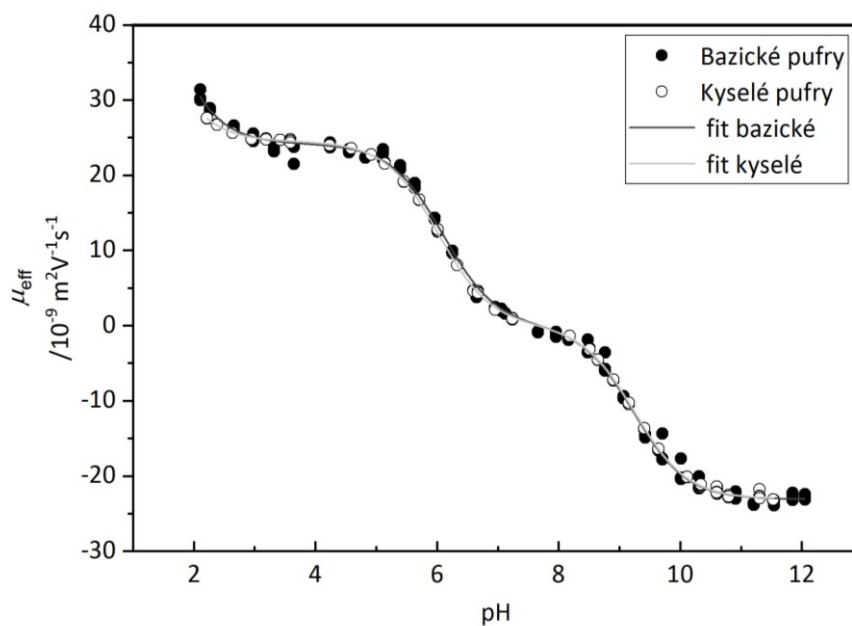
Náboj	μ_{lim}	σ	r
-	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	%
-1	27,46	0,19	0,69
+1	28,42	0,23	0,81
+2	62,5	36,2	57,9

Tabulka 16 pK_A hodnoty histidinu zkorigované na nulovou iontovou sílu pomocí AnglerFish se směrodatnými a relativními odchylkami σ a r , měřeno v bazických pufrch

Náboj	pK_A	σ	r
-	-	-	-
-1	9,272	0,021	0,23
+1	6,050	0,020	0,34
+2	1,39	0,65	47

AnglerFish dokázal určit problematický stupeň +2 s lepší přesností, nežli se to podařilo přímým fitováním a ruční korekcí. Přesto je i v tomto případě příslušný výsledek zatížený velkou chybou.

4.4 Porovnání hodnot



Hodnoty naměřené v obou sadách pufrů se zjevně překrývají. Přinejmenším pro látku nabitou do prvního stupně je vliv použití pufrů založených na jiné složce nepříliš znatelný.

4.4.1 Porovnání pK_A konstant

Program PeakMaster ve své databázi využívá hodnoty pK_A konstant a limitních mobilit, které jsou uvedené v Hirokawových tabulkách[22]. Proto se nabízí srovnat naměřené hodnoty i s nimi.

Tabulka 17 Srovnání pK_A konstant histidinu získaných jednotlivými způsoby. HT – hodnoty uvedené v Hirokawových tabulkách, KysA – hodnoty naměřené v sadě pufrů založených na kyselině, korekce provedena pomocí AnglerFish, BazA – hodnoty naměřené v sadě pufrů založených na bázi, korekce provedena pomocí AnglerFish, KysRu – hodnoty naměřené v sadě pufrů založených na kyselině, korekce provedena ručně, BazRu – hodnoty naměřené v sadě pufrů založených na bázi, korekce provedena ručně.

Náboj	HT	KysA	BazA	KysRu	BazRu
-	-	-	-	-	-
-1	9,33	$9,3032 \pm 0,0030$	$9,272 \pm 0,021$	$9,3086 \pm 0,0051$	$9,293 \pm 0,018$
+1	6,04	$5,9647 \pm 0,0028$	$6,050 \pm 0,020$	$5,9651 \pm 0,0058$	$6,044 \pm 0,017$
+2	2,01	$1,17 \pm 0,33$	$1,39 \pm 0,65$	$0,82 \pm 1,22$	$1,08 \pm 0,87$

Výsledky pro stupeň +2 byly vypočteny s velikou směrodatnou odchylkou. Nemůžeme je tedy považovat za spolehlivé a budou vyloučeny z dalších úvah. Příčinou nepřesného stanovení hodnot pro tento disociační stupeň je, že měření neprobíhalo dále než do pH 2, příslušná pK_A hodnota histidinu se ovšem nachází zhruba v této oblasti. Nezískalo se tedy dost dat pro přesnější určení.

Hodnoty získané ruční korekcí a korekcí pomocí AnglerFish jsou v rámci chyby shodné. Lze tedy vidět, že program poskytuje přesné hodnoty.

Hodnoty získané při měření v pufrch založených na bázi a kyselině se od sebe liší, rozdíl se ovšem projevuje až na třetím desetinném místě. pK_A pro -1 je v případě bazických pufrů nižší, naopak +1 je lehce zvednuté. Je možné, že se zde projevuje vliv rozdílné iontové atmosféry.

Při srovnání s hodnotami uvedenými v Hirokawových tabulkách vidíme, že mnohem bližší výsledek pro formu -1 poskytlo měření v pufrch založených na kyselině. Hodnoty se stále v rámci chyby od tabelované hodnoty liší, zřejmě je však výsledek oproti hodnotě získané z bazických pufrů správnější.

Naopak v případě náboje +1 jsou mnohem podobnější výsledky z měření v bazických pufrch. Zde se poskytnutý výsledek v rámci chyby shoduje s tabelovanou hodnotou. Pufrы založené na kyselině poskytly viditelně odchýlenější výsledek.

4.4.1 Porovnání limitních mobilit

Pro porovnání limitních mobilit se opět nabízí srovnání s hodnotami uvedenými v Hirokawových tabulkách.

Tabulka 18 Srovnání limitních mobilit histidinu získaných jednotlivými způsoby. HT – hodnoty uvedené v Hirokawových tabulkách, KysA – hodnoty naměřené v sadě pufrů založených na kyselině, korekce provedena pomocí AnglerFish, BazA – hodnoty naměřené v sadě pufrů založených na bázi, korekce provedena pomocí AnglerFish, KysRu – hodnoty naměřené v sadě pufrů založených na kyselině, korekce provedena ručně, BazRu – hodnoty naměřené v sadě pufrů založených na bázi, korekce provedena ručně.

Náboj	HT	KysA	BazA	KysRu	BazRu
-	10^{-9} $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^{-9} \text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^{-9} \text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^{-9} \text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^{-9} \text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$
-1	28,3	$27,341 \pm 0,033$	$27,46 \pm 0,19$	$26,814 \pm 0,060$	$26,86 \pm 0,16$
+1	26,8	$28,736 \pm 0,032$	$28,42 \pm 0,23$	$28,185 \pm 0,053$	$27,86 \pm 0,18$
+2	47,5	$63,2 \pm 20,6$	$62,5 \pm 36,2$	-	-

Výsledky pro náboj +2 jsou zatíženy velikou chybou a při ruční korekci je vůbec nebylo možné získat. Proto budou vynechány z dalších úvah.

Limitní mobility získané ruční korekcí a korekcí pomocí AnglerFish se od sebe již na prvním desetinném místě liší. Hodnoty poskytnuté pomocí AnglerFish jsou v případě obou sad pufrů vyšší nežli ty, které byly ručně zkorigované pomocí PeakMasteru. Použití jiného postupu vyhodnocení tedy vedlo k dosažení jiných výsledků.

Hodnoty získané z pufrů založených na kyselině a pufrů založených na bázi se od sebe naopak v rámci chyby liší jen minimálně. Z toho vyplývá, že odlišná iontová atmosféra přítomná v každé sadě pufrů zřejmě přinejmenším pro málo nabitě látky nemá postřehnutelný vliv na jejich pohyblivost.

Veškeré získané hodnoty limitních mobilit se od hodnot uvedených v Hirokawových tabulkách liší již na pozici jednotek. V případě náboje -1 nabývají výsledky nižších hodnot, než je tabelováno. Naopak pro náboj +1 jsou veškeré získané hodnoty vyšší. Zřejmě s sebou tedy odlišná použitá metoda pro určování limitních mobilit přinesla odlišné výsledky.

4.5 Imatinib

4.5.1 Experimentální podmínky a postupy

Před prvním měřením byly elektrody přístroje očištěny v ultrazvukové lázni. Nejprve byly po 10 minut ponořeny do deionizované vody a následně po 10 minut do isopropanolu. Byla připravená nová kapilára o vnitřním průměru 50 μm a délce 50,45 cm, v průběhu měření byla nahrazena kapilárou o stejném průměru a délce 50,3 cm. Obě kapiláry byly před prvním měřením propláchnuty 1M roztokem hydroxidu sodného a deionizovanou vodou. Před každým měřením byly proplachovány základním elektrolytem.

Z převážné většiny byly využity pufrы, které již byly použity pro měření histidinu v bazických pufrách (oddíl 4.3.1). Navíc bylo nutno připravit zásobní roztoky těchto látek: dimethylpyridin, morfolin. Koncentrace zásobních roztoků byla 0,5 M. Připravené pufrы měly iontovou sílu zhruba 20 mM.

Složení jednotlivých pufrů, jejich pH, puфраční kapacity a iontové síly jsou uvedeny v Tabulce 19. Pro každý pufr bylo pH změřeno třikrát, uveden je aritmetický průměr. Puфраční kapacita byla vypočítána v programu PeakMaster. Koncentrace kyseliny chlorovodíkové je ve všech pufrách 20 mM.

Tabulka 19 Složení, pH, puфраční kapacita β a iontová síla I základního elektrolytu, koncentrace HCl je ve všech pufrách 20 mM.

pufr	$C_{\text{báze}}$	pH	β	I
-	mM	-	mM	mM
HCl/prolin	25	2,116	36,42	20,00
HCl/prolin	40	2,267	36,16	20,00
HCl/prolin	100	2,681	39,33	20,00
HCl/prolin	200	3,003	42,09	20,00
HCl/prolin	400	3,346	43,91	20,00
HCl/ β -alanin	40	3,645	23,86	20,00
HCl/ β -alanin	60	3,937	30,99	20,00
HCl/ β -alanin	100	4,243	36,93	20,00

pufř	<i>C</i> _{báze}	pH	β	<i>I</i>
-	mM	-	mM	mM
HCl/ β -alanin	180	4,556	40,96	20,00
HCl/ β -alanin	300	4,823	42,99	20,00
HCl/pyridin	30	5,113	15,39	20,00
HCl/pyridin	40	5,393	23,04	20,00
HCl/pyridin	60	5,634	30,71	20,00
HCl/pyridin	100	5,963	36,84	20,00
HCl/pyridin	180	6,255	40,94	20,00
HCl/pyridin	400	6,598	43,75	20,00
HCl/BIS-TRIS	60	6,959	30,70	20,00
HCl/BIS-TRIS	80	7,127	34,54	20,00
HCl/dimethylpyridin	40	6,828	23,03	20,00
HCl/dimethylpyridin	60	7,136	30,70	20,00
HCl/dimethylpyridin	100	7,426	36,84	20,00
HCl/dimethylpyridin	180	7,688	40,94	20,00
HCl/dimethylpyridin	340	7,900	43,35	20,00
HCl/dimethylpyridin	650	8,026	44,64	20,00
HCl/morfolin	24	8,142	7,68	20,00
HCl/morfolin	30	8,352	15,35	20,00
HCl/morfolin	40	8,664	23,03	20,00
HCl/morfolin	60	8,970	30,72	20,01
HCl/morfolin	100	9,275	36,88	20,01
HCl/morfolin	180	9,574	41,03	20,02

Vzorek byl sestaven tak, že byl nejprve připraven 1,35mM roztok imatinibu. Do 500 μ l vialky bylo vpraveno 50 μ l tohoto roztoku, dále 10 μ l 3% roztoku DMSO, 440 μ l aktuálního základního elektrolytu. Koncentrace imatinibu ve vzorku tedy byla 0,135 mM. V průběhu měření bylo dávkování sníženo.

Dávkování bylo při měření prováděno hydrodynamicky tlakovým rozdílem 30 mbar po 5 s.

Měření probíhalo při napětí 10 kV. V kyselé oblasti bylo rovněž nezbytné působit tlakem 30 mbar.

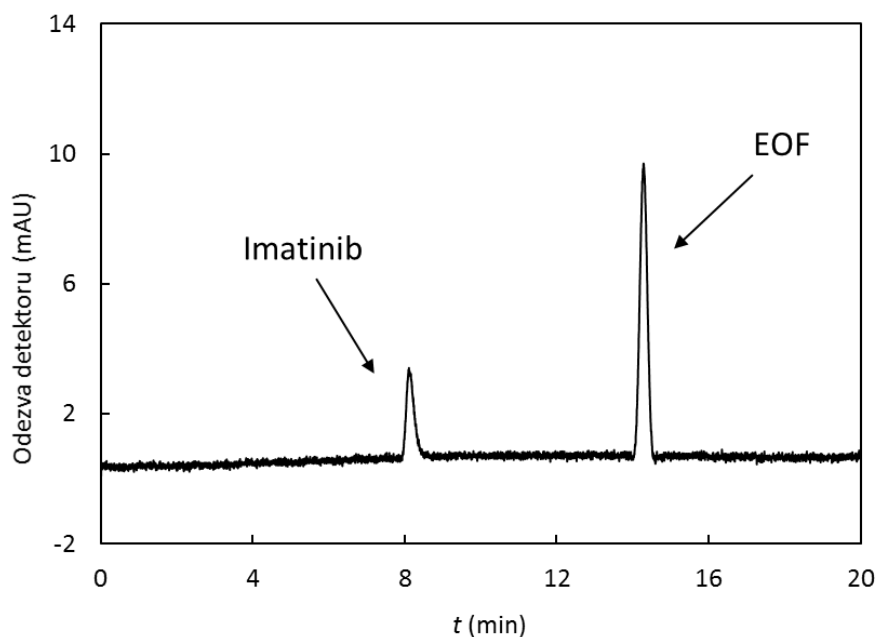
K detekci analytu byl využíván UV-Vis detektor. Migrační čas analytu byl vyhodnocován v programu CEval.

4.5.2 Výsledky měření

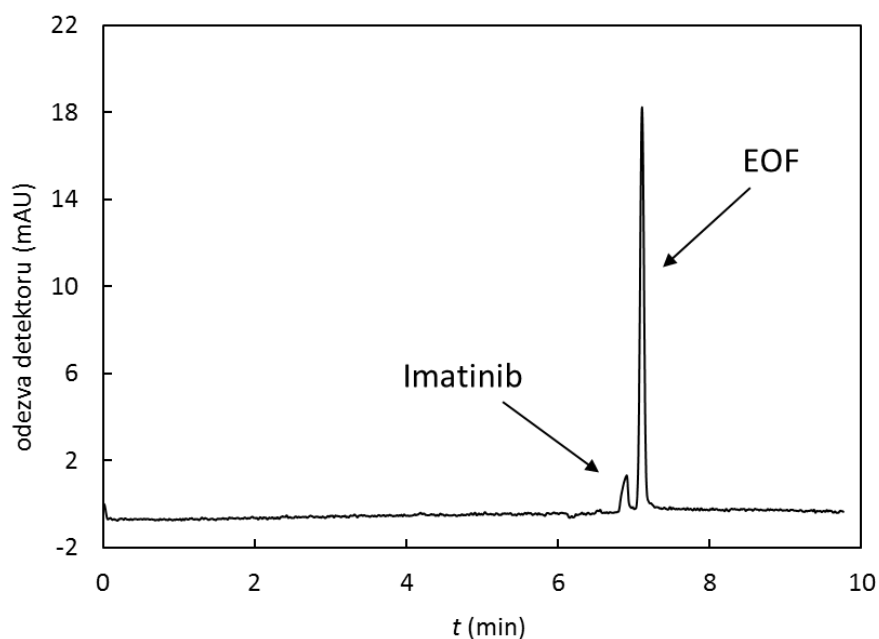
Každé měření bylo zopakováno minimálně třikrát. Měřilo se při stálém napětí 10 kV. V případě kyselých pufrů (od prolinových po BIS-TRISové) bylo nutné působit tlakem 30 mbar pro zkrácení doby analýzy.

Imatinib může být jedinež pozitivně nabitý, proto se vždy pohyboval s kladnou mobilitou oproti elektroosmotickému toku. Když se náboj zmenšoval, začala se na píku vzrůstající měrou projevovat elektromigrační disperze. Imatinib se rovněž silně adsorboval na stěny kapiláry. Píky imatinibu v důsledku získaly tvar „žraločích ploutví“ a daly se obtížně vyhodnocovat. Byla snaha stěnu kapiláry upravovat, nedosáhlo se tím ovšem žádného zlepšení.

Nakonec bylo tedy sníženo dávkování vzorku. Počínaje pufrů s BISTRISem, konče pufrů s morfolinem, bylo složení vzorku 20 μ l 1,35mM roztoku imatinibu, 10 μ l 3% roztoku DMSO a 470 μ l používaného základního elektrolytu. Na zředěnějším vzorku se menší měrou projevovala elektromigrační disperze, což umožnilo látku doměřit až do bodu, kdy její mobilita limitovala k nule.



Obrázek 10 Signál imatinibu v pufru o složení prolin/HCl 25/20 při 214 nm, tlak 30 mbar, napětí 5 kV



Obrázek 11 Signál imatinibu v pufru o složení morfolin/HCl 40/20 při 214 nm, bez tlaku, 10 kV

Migrační čas byl určován programem CEval. K vyhodnocení migračního času v blízkosti nuly bylo využito skutečnosti, že imatinib absorbuje při 260 nm, oproti tomu DMSO, který značil elektroosmotický tok, absorbuje při 214 nm a při 260 nm nikoliv. Využitím elektroferogramů získaných detekcí při obou vlnových délkách tedy bylo

možné od sebe píky obou látek odlišit. V oblastech, kde k překryvu nedocházelo, probíhalo vyhodnocení na základě elektroferogramu z 214 nm.

Pomocí CEvalu byly rovněž vypočítány efektivní mobility analytu, které jsou uvedeny v Tabulce 20.

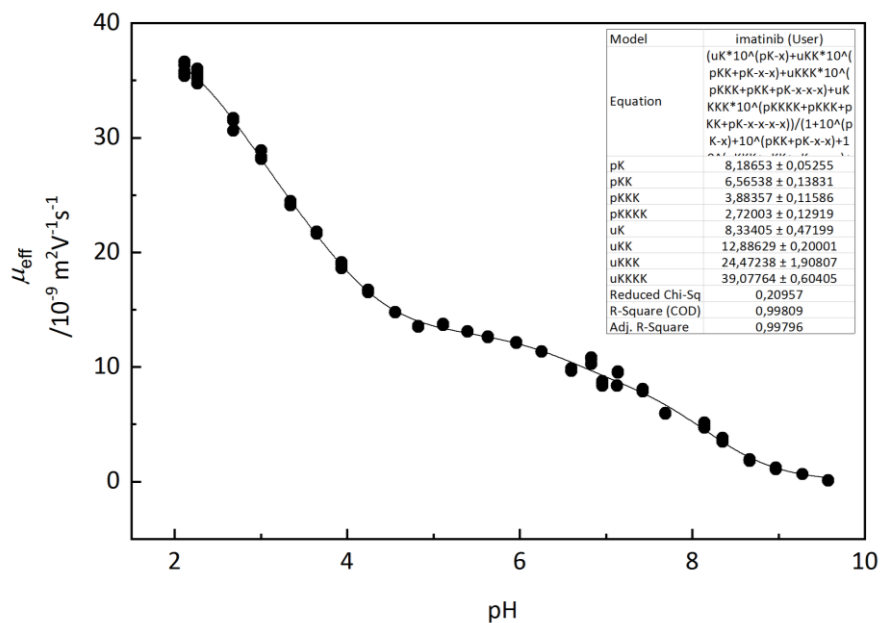
Tabulka 20 Naměřené mobility pro imatinib v jednotlivých pufrech, uvedené se směrodatnou odchylkou vypočtenou ze tří až pěti opakovaných měření

pH	$\mu_{\text{eff}} \pm s$ $10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$	pH	$\mu_{\text{eff}} \pm s$ $10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$	pH	$\mu_{\text{eff}} \pm s$ $10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$
2,116	36,0±0,5	5,113	13,70±0,05	7,426	8,0±0,1
2,267	35,4±0,5	5,393	13,09±0,02	7,688	5,94±0,03
2,681	31,3±0,4	5,634	12,62±0,04	7,900	3,62±0,02
3,003	28,4±0,3	5,963	12,09±0,04	8,026	1,59±0,07
3,346	24,2±0,2	6,255	11,34±0,02	8,142	4,9±0,2
3,645	21,8±0,1	6,598	9,7±0,1	8,352	3,7±0,1
3,937	19,0±0,2	6,959	8,5±0,1	8,664	1,86±0,05
4,243	16,7±0,1	7,127	8,38±0,02	8,970	1,15±0,06
4,556	14,77±0,02	6,828	10,7±0,2	9,275	0,643±0,002
4,823	13,53±0,04	7,136	9,53±0,04	9,574	0,09±0,02

Efektivní mobility μ_{eff} a příslušná pH byla vynesena do grafu v programu Origin a proložena příslušnou regresní funkcí ve tvaru:

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\mu_{\text{KKKK}} \cdot 10^{\text{pK}_{\text{KKKK}} + \text{pK}_{\text{KKK}} + \text{pK}_{\text{KK}} + \text{pK}_{\text{K}} - 4\text{pH}} + \mu_{\text{KKK}} \cdot 10^{\text{pK}_{\text{KKK}} + \text{pK}_{\text{KK}} + \text{pK}_{\text{K}} - 3\text{pH}} + \mu_{\text{KK}} \cdot 10^{\text{pK}_{\text{KK}} + \text{pK}_{\text{K}} - 2\text{pH}} + \mu_{\text{K}} \cdot 10^{\text{pK}_{\text{K}} - \text{pH}}}{1 + 10^{\text{pK}_{\text{KKKK}} + \text{pK}_{\text{KKK}} + \text{pK}_{\text{KK}} + \text{pK}_{\text{K}} - 4\text{pH}} + 10^{\text{pK}_{\text{KKK}} + \text{pK}_{\text{KK}} + \text{pK}_{\text{K}} - 3\text{pH}} + 10^{\text{pK}_{\text{KK}} + \text{pK}_{\text{K}} - 2\text{pH}} + 10^{\text{pK}_{\text{K}} - \text{pH}}} \quad (11)$$

kde μ_{KKKK} , μ_{KKK} , μ_{KK} , μ_{K} jsou pohyblivosti jednotlivých forem a pK_{KKKK} , pK_{KKK} , pK_{KK} , pK_{K} jejich rovnovážné disociační konstanty.



Obrázek 12 Závislost mobility na pH pro imatinib proložená příslušnou fitovací funkcí

Proložením fitovací funkcí byly získané následující hodnoty pro 20mM iontovou sílu:

Tabulka 21 Nezkorigované pK_A konstanty získané pro imatinib se směrodatnými odchylkami σ

Náboj	pK_A	σ
-	-	-
+1	8,187	0,053
+2	6,57	0,14
+3	3,88	0,12
+4	2,72	0,13

Tabulka 22 Nezkorigované limitní mobility získané pro imatinib se směrodatnými odchylkami σ

Náboj	μ_{lim}	σ
-	$10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$	$10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$
+1	8,33	0,47
+2	12,89	0,20
+3	24,5	19,1
+4	39,08	0,60

Mobilita pro třetí disociační stupeň byla určena s vysokou chybou, zřejmě za to může skutečnost, že se pK_A pro +3 a +4 nacházejí velice blízko sebe. Ostatní výsledky nesou rozumnou chybu.

4.5.2 Ruční korekce

Ruční korekce pK_A byla provedena dosazením do rovnice (4) v oddíle 2.5.1. Vždy ve tvaru odpovídajícím náboji, který se korigoval.

Tabulka 23 pK_A konstanty získané pro imatinib ruční korekcí se směrodatnými odchylkami σ

Náboj	pK_A	σ
-	-	-
+1	8,129	0,053
+2	6,39	0,14
+3	3,60	0,12
+4	2,32	0,13

Limitní mobility byly zkorigovány pomocí programu PeakMaster, postupem uvedeným v oddíle 2.5.3.

Tabulka 24 Limitní mobility získané pro imatinib ruční korekcí se směrodatnými odchylkami σ

Náboj	μ_{lim}	σ
-	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$
+1	11,99	0,47
+2	20,31	0,20
+3	36,4	19,1
+4	58,56	0,60

Navzdory obavám, že blízkost 3. a 4. disociačního stupně neumožní parametry vyhodnotit, se podařilo provést korekci. Pouze mobilita pro +3 je stále zatížena závažnou chybou.

4.5.3 Korekce pomocí AnglerFish

Do programu AnglerFish bylo zadáno složení všech užitých pufrů, zároveň byla zadána jejich pH. Program si tak sám zkorigoval koncentraci pufrů, aby skutečnému pH odpovídala. K jednotlivým pufrům byla připsána experimentálně naměřená data. Následně byla nafitována závislost mobility na pH a výsledky byly zkorigovány na nulovou iontovou sílu.

Tabulka 25 Limitní mobility získané pro imatinib pomocí programu AnglerFish se směrodatnými a relativními odchylkami σ a r

Náboj	μ_{lim}	σ	r
-	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	%
+1	13,96	0,36	2,5
+2	23,70	0,85	3,6
+3	40,5	15,7	38
+4	56,71	0,82	1,5

Tabulka 26 pK_A konstanty získané pro imatinib pomocí programu AnglerFish se směrodatnými a relativními odchylkami σ a r

Náboj	pK_A	σ	r
-	-	-	%
+1	8,203	0,056	0,69
+2	5,58	0,21	3,8
+3	3,10	0,30	9,6
+4	2,97	0,46	15

Vidíme, že se pK_A konstanty pro stupně +3 a +4 nacházejí velice blízko u sebe. Tyto hodnoty by běžnými metodami bylo velice obtížné určit. I zde jsou oproti ostatním zatíženy větší chybou.

Limitní mobilita pro stupeň +3 je zatížena dost velikou chybou, zřejmě je to dáno tím, jak blízko u sebe se příslušná pK_A nacházejí.

Výsledků bylo dosaženo s rozumnou přesností a oproti ruční korekci s mnohem menší mírou námahy.

4.5.4 Srovnání obou metod korekce

Tabulka 27 Porovnání pK_A konstant imatinibu získaných korekcí pomocí programu AnglerFish a ruční korekcí

Náboj	Ruční korekce	AnglerFish
-	-	-
+1	8,129±0,053	8,203±0,056
+2	6,39±0,14	5,58±0,21
+3	3,60±0,12	3,10±0,30
+4	2,32±0,13	2,97±0,46

Při srovnání pK_A konstant získaných oběma způsoby korekce vidíme, že se od sebe hodnoty se vzrůstajícím stupněm disociace čím dál výrazněji liší. Pro stupeň +1 se hodnoty v rámci chyby poměrně shodují, pro každý další stupeň se však od sebe vzrůstající měrou vzdalují. Výsledky se tedy příliš neshodují.

Hodnoty získané ruční korekcí mají stabilně nízkou chybu. V případě hodnot získaných z AnglerFish se však chyba s každým dalším stupněm navyšuje. Větší množství fitovaných parametrů zřejmě vede ke snížení přesnosti.

Za povšimnutí stojí pozice konstant +3 a +4 vůči sobě. AnglerFish stanovil obě konstanty velice blízko sebe, natolik, že se v rámci chyby překrývají. Metodou ruční korekce ovšem byly určeny s větším rozestupem. Zřejmě touto metodou ani není možné stanovit dvě hodnoty, které jsou si natolik blízké.

Tabulka 28 Porovnání limitních mobilit imatinibu získaných korekcí pomocí programu AnglerFish a ruční korekcí

Náboj	Ruční korekce	AnglerFish
-	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$
+1	11,99±0,47	13,96±0,36
+2	20,31±0,20	23,70±0,85
+3	36,4±19,1	40,5±15,7
+4	58,56±0,60	56,71±0,82

V první řadě je patrné, že byla mobilita pro stupeň +3 oběma metodami určena se značnou chybou, nemůžeme tedy získanou hodnotu pokládat za spolehlivou. Zřejmě je to dáno skutečností, že se pK_A konstanty pro +3 a +4 nacházejí velice blízko sebe.

Dále zde vidíme, že program AnglerFish podal pro hodnoty +1 a +2 vyšší hodnoty, hodnota získaná pro +4 je ovšem nižší, než tomu bylo v případě ruční korekce. Zřejmě se tedy vlivem korekce experimentálních dat na iontovou sílu posouvá získaná závislost způsobem, který k podobné nesrovnalosti vede. Výsledky se ani v rámci chyby v žádném z případů neshodují.

Přesnost, které bylo dosaženo oběma metodami, se zdá být srovnatelná.

Je ovšem nutno uvést, že je korekce pomocí AnglerFish mnohem jednodušší a časově úspornější.

5 Závěr

V teoretické části byl stručně popsán princip kapilární zónové elektroforézy a jevy, jež se při použití této metody projevují. Dále byly popsány přístupy ke korekcím na iontovou sílu, počínaje staršími přístupy a konče novým přístupem vyvinutým v naší laboratoři.

V experimentální části byly proměřeny závislosti efektivních mobilit histidinu na pH ve dvou sadách pufrů, jedné založené na kyselině, coby pufrující složce, druhé založené na bázi. V obou případech byly stanoveny limitní mobility a pK_A konstanty analytu, jednak užitím ruční korekce na iontovou sílu, a pak také užitím nového programu AnglerFish vytvořeného v naší laboratoři Michalem Malým. Výsledky obou měření a získané oběma způsoby korekce byly porovnány.

Rovněž byla proměřena závislost efektivních mobilit na pH pro imatinib a byly stanoveny a zkorigovány jeho limitní mobility a pK_A .

Korekce prováděná postupem implementovaným v programu AnglerFish umožňuje dosažení stejně přesných hodnot jako dřívější postupy. Jelikož je tato korekce principiálně správná, bude poskytovat i správnější výsledky.

Závěrem budiž, že bylo dosaženo splnění všech předsevzatých cílů.

6 Zdroje

- [1] K. Štulík and Univerzita Karlova., *Analytické separační metody*. Karolinum, 2004.
- [2] V. Kasicka, “Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod.,” *Chem. List.*, vol. 91, no. 5, pp. 321–325, 1997.
- [3] V. Kašička, “Capillary electrophoresis of peptides,” *Electrophoresis*, vol. 20, no. 15–16, pp. 3084–3105, Oct. 1999.
- [4] M.-Y. Tong, C. Jiang, and D. W. Armstrong, “Fast detection of *Candida albicans* and/or bacteria in blood plasma by ‘sample-self-focusing’ using capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 53, no. 1, pp. 75–80, Sep. 2010.
- [5] A. W. Lantz, B. F. Brehm-Stecher, and D. W. Armstrong, “Combined capillary electrophoresis and DNA-fluorescence in situ hybridization for rapid molecular identification of *Salmonella Typhimurium* in mixed culture,” *Electrophoresis*, vol. 29, no. 12, pp. 2477–2484, Jun. 2008.
- [6] K. Včeláková, I. Zusková, E. Kenndler, and B. Gaš, “Determination of cationic mobilities and pKa values of 22 amino acids by capillary zone electrophoresis,” *Electrophoresis*, vol. 25, no. 2, pp. 309–317, Jan. 2004.
- [7] D. Li, S. Fu, and C. A. Lucy, “Prediction of Electrophoretic Mobilities. 3. Effect of Ionic Strength in Capillary Zone Electrophoresis,” *Anal. Chem.*, vol. 71, no. 3, pp. 687–699, Feb. 1999.
- [8] M. Gas, B; Jaros, M; Hruska, V; Zuskova, I; Stedry, “PeakMaster - A freeware simulator of capillary zone electrophoresis,” *Lc Gc Eur.*, vol. 18, no. 5, pp. 282–+, 2005.
- [9] S. S. Bahga, M. Bercovici, and J. G. Santiago, “Ionic strength effects on electrophoretic focusing and separations,” *Electrophoresis*, vol. 31, no. 5, pp. 910–919, Mar. 2010.
- [10] V. Hruška, M. Jaroš, and B. Gaš, “Simul 5 – Free dynamic simulator of electrophoresis,” *Electrophoresis*, vol. 27, no. 5–6, pp. 984–991, Mar. 2006.
- [11] S. Štěpánová and V. Kašička, “Recent developments and applications of capillary and microchip electrophoresis in proteomics and peptidomics (2015-mid 2018),” *J. Sep. Sci.*, vol. 42, no. 1, pp. 398–414, Jan. 2019.
- [12] D. Corradini and L. Spreccacenero, “Dependence of the Electroosmotic Flow in

Bare Fused-Silica Capillaries from pH, Ionic Strength and Composition of Electrolyte Solutions Tailored for Protein Capillary Zone Electrophoresis,” *Chromatographia*, vol. 58, no. 9–10, pp. 587–596.

- [13] J. Horvath and V. Dolník, “Polymer wall coatings for capillary electrophoresis,” *Electrophoresis*, vol. 22, no. 4, pp. 644–655, Feb. 2001.
- [14] L. Leclercq, M. Morvan, J. Koch, C. Neusüß, and H. Cottet, “Modulation of the electroosmotic mobility using polyelectrolyte multilayer coatings for protein analysis by capillary electrophoresis,” *Anal. Chim. Acta*, Jan. 2019.
- [15] L. Sola and M. Chiari, “Tuning capillary surface properties by charged polymeric coatings,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1414, pp. 173–181, Oct. 2015.
- [16] B. Gaš, V. Hruška, M. Dittmann, F. Bek, and K. Witt, “Prediction and understanding system peaks in capillary zone electrophoresis,” *J. Sep. Sci.*, vol. 30, no. 10, pp. 1435–1445, Jul. 2007.
- [17] A. Rogacs and J. G. Santiago, “Temperature Effects on Electrophoresis,” *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 10, pp. 5103–5113, May 2013.
- [18] G. L. Erny, E. T. Bergström, and D. M. Goodall, “Electromigration dispersion in capillary zone electrophoresis,” *J. Chromatogr. A*, vol. 959, no. 1–2, pp. 229–239, Jun. 2002.
- [19] S. S. Bahga, M. Bercovici, and J. G. Santiago, “Ionic strength effects on electrophoretic focusing and separations,” *Electrophoresis*, vol. 31, no. 5, pp. 910–919, Mar. 2010.
- [20] C. J. Evenhuis *et al.*, “Reliable electrophoretic mobilities free from Joule heating effects using CE,” *Electrophoresis*, vol. 28, no. 20, pp. 3759–3766, Oct. 2007.
- [21] I. Zusková, A. Novotná, K. Včeláková, and B. Gaš, “Determination of limiting mobilities and dissociation constants of 21 amino acids by capillary zone electrophoresis at very low pH,” *J. Chromatogr. B*, vol. 841, no. 1–2, pp. 129–134, Sep. 2006.
- [22] T. Hirokawa *et al.*, “Table of isotachophoretic indices,” *J. Chromatogr. A*, vol. 271, no. 2, pp. D1–D106, Jan. 1983.
- [23] A. Hochhaus, “Satelite Symposium V, Meet-the-Professor Sessions I and II, Main Sessions I-IX,” *Ann. Hematol.*, vol. 83, no. 0, pp. S59–S137, Feb. 2004.
- [24] L. Kumar, M. Kumari, and H. Menon, “STI-571 (Gleevec) in the treatment of

chronic myeloid leukaemia.,” *Natl. Med. J. India*, vol. 15, no. 5, p. 298.

- [25] “Imatinib Mesylate Monograph for Professionals - Drugs.com.” [Online]. Available: <https://www.drugs.com/monograph/imatinib-mesylate.html>. [Accessed: 29-Apr-2019].
- [26] K. Mioduszevska *et al.*, “Overview of experimental and computational methods for the determination of the pK_a values of 5-fluorouracil, cyclophosphamide, ifosfamide, imatinib and methotrexate,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 97, pp. 283–296, Dec. 2017.
- [27] V. Šolínová, V. Kašička, D. Koval, M. Česnek, and A. Holý, “Determination of acid–base dissociation constants of amino- and guanidinopurine nucleotide analogs and related compounds by capillary zone electrophoresis,” *Electrophoresis*, vol. 27, no. 5–6, pp. 1006–1019, Mar. 2006.
- [28] M. Boublik, “Stanovení limitních elektroforetických mobilit nabitých cyklodextrinů,” Univerzita Karlova, 2013.
- [29] E. Pitts, “An extension of the theory of the conductivity and viscosity of electrolyte solutions,” *Proc. R. Soc. London. Ser. A. Math. Phys. Sci.*, vol. 217, no. 1128, pp. 43–70, Mar. 1953.
- [30] W. Friedl, J. C. Reijenga, and E. Kenndler, “Ionic strength and charge number correction for mobilities of multivalent organic anions in capillary electrophoresis,” *J. Chromatogr. A*, vol. 709, no. 1, pp. 163–170, Aug. 1995.
- [31] R. M. Fuoss, “Ionic Association. I. Derivation of Constants from Conductance Data,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 79, no. 13, pp. 3301–3303, Jul. 1957.
- [32] R. M. Fuoss and L. Onsager, “Conductance of Unassociated Electrolytes,” *J. Phys. Chem.*, vol. 61, no. 5, pp. 668–682, May 1957.